



TITLE:

メダカを用いた小胞体ストレス起因性アポトーシスの解析ならびに小胞体ストレスセンサーIRE1阻害剤評価系の確立(Abstract_要旨)

AUTHOR(S):

陳, 炳碩

CITATION:

陳, 炳碩. メダカを用いた小胞体ストレス起因性アポトーシスの解析ならびに小胞体ストレスセンサーIRE1阻害剤評価系の確立. 京都大学, 2020, 博士(理学)

ISSUE DATE:

2020-03-23

URL:

<https://doi.org/10.14989/doctor.k22292>

RIGHT:

学位規則第9条第2項により要約公開

(続紙 1)

京都大学	博 士（理 学）	氏名	陳 炳碩
論文題目	メダカを用いた小胞体ストレス起因性アポトーシスの解析 ならびに小胞体ストレスセンサーIRE1 阻害剤評価系の確立		
(論文内容の要旨)			
<p>小胞体は膜タンパク質や分泌タンパク質が折りたたみにより立体構造を獲得する細胞小器官である。しかし、様々な要因により小胞体内タンパク質の折りたたみ能力が低下すると、小胞体ストレスが発生する。細胞はこのストレスに対し、小胞体ストレス応答を発動させ恒常性の回復を試みる。しかし、恒常性が回復できない場合、この応答機構はアポトーシスを誘導する。この小胞体ストレス起因性アポトーシスは糖尿病やアルツハイマー病など様々な疾患やがんで見られる現象であり、その解析の重要性が高まっている。</p> <p>現在まで、細胞レベルでの小胞体ストレス応答解析の実験系の多くでは化学物質により小胞体ストレスを惹起している。しかし、この系では通常の生理条件下では有り得ないレベルの強い小胞体ストレスが引き起こされ、あらゆるタンパク質が同時に構造異常となってしまう。特に、小胞体ストレス応答の生存シグナルとアポトーシスシグナルが同時に誘導されてしまうため、シグナル変換の分子メカニズムの解析が非常に困難である。</p> <p>そこで、本研究ではメダカをモデル動物として用いた個体レベルでの解析に着目した。個体レベルでの生理的な環境で持続的に小胞体ストレスを誘導して解析することにより化学物質を用いた実験系の問題点を解決できると考えた。モデル動物としてのメダカの特徴を生かし、遺伝子破壊による発生段階での持続的なストレスの解析に挑んだ。</p> <p>並びに、本研究では抗がん剤として注目されている小胞体ストレス応答のIRE1-XBP1経路をターゲティングした阻害剤の評価系の確立に挑んだ。通常IRE1経路の活性をスクリーニングする実験系では小胞体ストレス誘導剤により過剰な小胞体ストレスを誘導させる。しかし、この実験系ではIRE1 経路以外にもIRE1 と関係している様々な経路が同時に活性化してしまう。そこで本研究では小胞体ストレスを誘導せずIRE1-XBP1 経路のみを活性化させ阻害剤を評価する新しいスクリーニング系の確立を目指した。</p>			

第一章 meigo 遺伝子破壊メダカにおける持続的小胞体ストレス応答の解析

第一章ではメダカの特定遺伝子の破壊により持続的な小胞体ストレスを誘導させ、小胞体ストレス起因性アポトーシスの解析法の確立に挑んだ。糖核酸トランスポーターであるメダカのmeigo遺伝子を破壊し、小胞体内タンパク質の糖鎖付加異常による小胞体ストレスを誘導することで、それに起因するアポトーシスの解析を試みた。TALEN法によりmeigo遺伝子破壊メダカを作出し、解析を行った結果、meigo遺伝子破壊メダカでは発生段階で持続的小胞体ストレスを伴う重篤な表現型が生じることがわかった。特に、発生後期から異常な心臓の表現型が生じ、血流が停止し全て致死に至ることがわかった。

次に、アポトーシスの誘導を個体レベルでイメージングし解析するため、PhiC31 integraseを用いた遺伝子導入法により2種類のアポトーシス可視化メダカを作出した。一つ目はFRET現象の変化によりアポトーシス誘導を可視化できるSCAT (Sensor for activated caspases based on FRET) プローブを導入したメダカであり、もう一つはCaspase 3の活性化により蛍光を発することでアポトーシスを可視化するC3Ai (Caspase3 activity indicator) プローブを導入したメダカである。これらのメダカシステムを用いてアポトーシスの発生を調べた結果、メダカの発生初期段階で誘導される生理的なアポトーシスをイメージングすることに成功した。

また、作出したアポトーシス可視化メダカシステムを用いてmeigo遺伝子破壊メダカにおけるアポトーシスの誘導を調べた。その結果、meigo遺伝子破壊メダカの発生段階でメダカ胚全体にアポトーシスが誘導されることが観察され、特に異常な表現型が見られた心臓で強くアポトーシスが誘導されることがわかった。次に、meigo遺伝子破壊メダカシステムを小胞体ストレス応答の生存シグナルを恒常的に発現するメダカシステムと掛け合わせ回復実験を行った。その結果、興味深いことにmeigo遺伝子破壊メダカで生じる心臓を含む異常な表現型が正常に戻り、全て孵化できるようになった。また、アポトーシス誘導も生存シグナルの恒常的発現により減少されることがわかった。

第二章 小胞体ストレスセンサーIRE1 を標的とした阻害剤評価系の確立

第二章では小胞体ストレスセンサーを標的とした阻害剤のスクリーニング系に関する解析を行った。小胞体ストレスセンサーの内IRE1経路は抗がん剤の新しい標的として注目されているが、未だ実用的な抗がん剤は開発されていない。そこで本研究では小胞体ストレス誘導剤を使わずIRE1経路のみを活性化させることで、より特異的な阻害剤をスクリーニングする新しい実験系を確立することにした。また、遺伝子破壊メダカ胚の致死性の表現型に着目した遺伝学的な表現型解析により個体レベルのスクリーニング系を確立することを目指した。

まず、IRE1 の機能を欠損させるため、TALEN法によりIRE1 α 遺伝子破壊細胞の作製を行った。その後、IRE1-XBP1経路の活性を定量化するため、XBP1の下流にルシフェラーゼレポーターを導入したstable cell line を作製した。

次に、IRE1経路のみを活性化させるため、1NM-PP1処理によりIRE1のRNase活性のみが生じる変異体(I642G)に着目し解析を行った。IRE1変異体の発現ベクターを細胞に導入した結果、1NM-PP1 処理によりIRE1-XBP1 経路のみが活性化され、実際にIRE1阻害剤の効果を評価することに成功した。

次に、メダカ胚を用いた個体レベルのIRE1特異的阻害剤評価系を確立することにした。IRE1 α /ATF6 α 二重遺伝子破壊メダカ胚に生じる致死性の表現型を利用し、ATF6 α 遺伝子破壊メダカ胚に化合物を投与することによってIRE1経路阻害剤のスクリーニングを行なった。その結果、表現型スクリーニングによりIRE1 特異的阻害剤が評価できた。スクリーニングにより得られた化合物、K114 においてIRE1 活性の阻害効果が*in vitro* アッセイにより確認できた。また、実際にがん細胞をK114 で処理した結果、がん細胞の生存率が減少した。

(続紙 2)

(論文審査の結果の要旨)

第一章の結果から、meigo遺伝子はメダカの発生に重要な働きをすること、また meigo遺伝子破壊により生じる異常な表現型とアポトーシスの誘導は小胞体の恒常性の崩壊に起因することが示唆された。これにより、meigo遺伝子破壊メダカを用いた個体レベルの実験系により、小胞体ストレス起因性アポトーシス解析の可能性が開かれた。

第二章の結果から、IRE1 変異体を用いることによりIRE1 経路のみを活性化させ、IRE1 活性を評価する新しい細胞レベルの実験系を確立した。また、遺伝子破壊メダカ胚を用いた表現型解析によりIRE1 経路の特異的阻害剤をスクリーニングできる個体レベルの実験系を確立した。これにより得られた化合物がIRE1 阻害剤としてがん細胞の増殖に影響を与えることを示し、簡単で迅速な個体レベルの抗がん剤のアッセイ系を確立することに成功した。

以上のように本論文は、小胞体ストレス起因性アポトーシスの個体レベルでの解析方法を確立し、さらに小胞体ストレスセンサーIRE1 を標的とした新規阻害剤評価系を確立したものである。よって、本論文は博士（理学）の学位論文として価値あるものと認める。また、令和2年1月14日、論文内容とそれに関連した事項について試問を行った結果、合格と認めた。

要旨公表可能日： 年 月 日以降